

APPLICATION UNDER UNITED STATES PATENT LAWS

Atty. Dkt. No. PW 282413
(M#)

Invention: Nucleotide Sequences Coding for the ThrE Gene and Process for the Enzymatic Production of L-Threonine Using Coryneform Bacteria

Inventor (s): Petra ZIEGLER
Lothar EGGELING
Hermann SAHM
Georg THIERBACH

jc971 U.S. PTO
09/963521
09/27/01

Pillsbury Winthrop LLP
Intellectual Property Group
1600 Tysons Boulevard
McLean, VA 22102
Attorneys
Telephone: (703) 905-2000

This is a:

- Provisional Application
- Regular Utility Application
- Continuing Application
 - The contents of the parent are incorporated by reference
- PCT National Phase Application
- Design Application
- Reissue Application
- Plant Application
- Substitute Specification
Sub. Spec Filed _____
in App. No. _____ / _____
- Marked up Specification re
Sub. Spec. filed _____
In App. No. _____ / _____

SPECIFICATION

Neue für das thrE-Gen codierende Nukleotidsequenzen und
Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Threonin mit
coryneformen Bakterien

Gegenstand der Erfindung sind für das thrE-Gen kodierende
5 Nukleotidsequenzen und Verfahren zur fermentativen
Herstellung von L-Threonin unter Verwendung von
coryneformen Bakterien, in denen das thrE-Gen verstärkt
wird.

Stand der Technik

10 L-Threonin findet in der Tierernährung, in der Humanmedizin
und in der pharmazeutischen Industrie Anwendung.

Es ist bekannt, daß L-Threonin durch Fermentation von
Stämmen coryneformer Bakterien insbesondere *Corynebacterium*
glutamicum hergestellt werden kann. Wegen der großen
15 Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der
Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensbesserungen können
fermentationstechnische Maßnahmen wie z.B. Rührung und
Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der
Nährmedien wie z.B. die Zuckerkonzentration während der
20 Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch
z.B. Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen
Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst
betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser
25 Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion
und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man
Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. das
Threonin-Analogon α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure (AHV) oder
auxotroph für regulatorisch bedeutsame Aminosäuren sind und
30 L-Threonin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der
rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung L-Threonin
produzierender Stämme von *Corynebacterium* eingesetzt, indem

man einzelne Threonin-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die L-Threonin-Produktion untersucht.

Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue
5 Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von L-
Threonin bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

L-Threonin findet in der Tierernährung, in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie Anwendung. Es besteht
10 daher ein allgemeines Interesse daran neue verbesserte Verfahren zur Herstellung von L-Threonin bereitzustellen.

Gegenstand der Erfindung ist eine in coryneformen Mikroorganismen replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA mit der Herkunft *Corynebacterium*, die zumindest die
15 Nukleotidsequenz enthält, die für das *thrE*-Gen, dargestellt in der SEQ-ID-No. 1 und SEQ-ID-No.3, codiert.

Gegenstand ist ebenfalls eine replizierbare DNA gemäß Anspruch 1 mit:

- (i) den Nukleotidsequenzen, gezeigt in SEQ-ID-No. 1
20 oder SEQ-ID-No.3, die für das *thrE*-Gen codieren, oder
- (ii) mindestens einer Sequenz, die den Sequenzen (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder
- 25 (iii) mindestens einer Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und/oder gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Ebenso sind coryneforme Mikroorganismen, insbesondere der
30 Gattung *Corynebacterium*, transformiert durch die Einführung der genannten replizierbaren DNA Gegenstand der Erfindung.

Die Erfindung betrifft schließlich ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Threonin unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits L-Threonin produzieren und in denen die für das thrE-Gen 5 codierende(n) Nukleotidsequenz(en) verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die 10 entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

15 Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Threonin aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke; Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien, insbesondere der Gattung 20 *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere 25 der Art *Corynebacterium glutamicum*, sind besonders die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
30 Corynebacterium melassecola ATCC17965
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Brevibacterium flavum ATCC14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020
35 und daraus hergestellte L-Threonin produzierende Mutanten bzw. Stämme, wie beispielsweise

Corynebacterium glutamicum ATCC21649
Brevibacterium flavum BB69
Brevibacterium flavum DSM5399
Brevibacterium lactofermentum FERM-BP 269
5 Brevibacterium lactofermentum TBB-10

Den Erfindern gelang es, das *thrE*-Gen von *Corynebacterium glutamicum* zu isolieren. Zur Isolierung des *thrE*-Gens wird zunächst eine im *thrE*-Gen defekte Mutante von *C. glutamicum* hergestellt. Hierzu wird ein geeigneter Ausgangsstamm wie
10 z. B. ATCC14752 oder ATCC13032 einem Mutagenese-Verfahren unterworfen.

Klassische Mutagenese-Verfahren sind die Behandlung mit Chemikalien wie z. B. N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidin oder UV-Bestrahlung. Derartige Verfahren zur
15 Mutationsauslösung sind allgemein bekannt und können unter anderem bei Miller (A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) oder im Handbuch "Manual of Methods for General
20 Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) nachgelesen werden.

Ein anderes Mutagenese-Verfahren ist die Methode der Transposonmutagenese bei der die Eigenschaft eines Transposons ausgenutzt wird in DNA-Sequenzen zu "springen" und dadurch die Funktion des betreffenden Gens zu stören bzw. auszuschalten. Transposons coryneformer Bakterien sind in der Fachwelt bekannt. So wurden aus *Corynebacterium xerosis* Stamm M82B das Erythromycinresistenz-Transposon
25 Tn5432 (Tauch et al., Plasmid (1995) 33: 168-179) und das
30 Chloramphenicolresistenz-Transposon Tn5546 isoliert.

Ein anderes Transposon ist das Transposon Tn5531 das bei Ankri et al. (Journal of Bacteriology (1996) 178: 4412-4419) beschrieben wird und beispielhaft im Laufe der vorliegenden Erfindung eingesetzt wurde. Das Transposon
35 Tn5531 enthält das *aph3* Kanamycinresistenzgen und kann in Form des Plasmidvektors pCGL0040 verabreicht werden, der in

Figur 1 dargestellt ist. Die Nukleotidsequenz des Transposons Tn5531 ist unter der Zugangsnummer (accession number) U53587 bei dem National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) frei verfügbar.

- 5 Nach erfolgter Mutagenese vorzugsweise Transposon-Mutagenese wird eine im thrE-Gen defekte Mutante gesucht. Eine im thrE-Gen defekte Mutante wird daran erkannt, daß sie auf Minimalagar gutes Wachstum, aber auf Minimalagar, der mit Threonin haltigen Oligopeptiden wie z. B. dem
- 10 Tripeptid Threonyl-threonyl-Threonin supplementiert wurde, schlechtes Wachstum zeigt.

Ein Beispiel für eine derartige Mutante ist der Stamm ATCC14752ΔilvAthrE::Tn5531.

- Ein auf die beschriebene Weise herstellter Stamm kann
- 15 dann für die Isolierung und Klonierung des thrE-Gens verwendet werden.

Hierzu kann eine Genbank des interessierenden Bakteriums angelegt werden. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben.

- 20 Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine
- 25 sehr bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495 - 508 (1987)) in λ-Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032, die mit Hilfe des
- 30 Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E.coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde. Für die vorliegende Erfindung eignen sich solche Vektoren, die in
- 35 coryneformen Bakterien vorzugsweise Corynebacterium glutamicum replizieren. Derartige Vektoren sind aus dem

Stand der Technik bekannt; als Beispiel sei der Plasmidvektor pZ1 genannt, der bei Menkel et al. (Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554) beschrieben ist. Die auf die beschriebene Weise erhaltene

5 Genbank wird anschließend mittels Transformation oder Elektroporation in den im thrE-Gen defekten Indikatorstamm überführt und solche Transformanten gesucht, die die Fähigkeit besitzen, in Gegenwart Threonin haltiger Oligopeptide auf Minimalagar zu wachsen. Das klonierte DNA-

10 Fragment kann anschließend einer Sequenzanalyse unterzogen werden.

Bei Verwendung einer durch Tn5531-Mutagenese erzeugten Mutante eines coryneformen Bakteriums wie z. B. der Stamm ATCC14752ΔilvAthrE::Tn5531 kann das thrE::Tn5531-Allel

15 direkt unter Ausnutzung des in ihm enthaltenen Kanamycinresistenzgens aph3 kloniert und isoliert werden. Hierzu verwendet man bekannte Kloniervektoren wie z. B. pUC18 (Norlander et al., Gene (1983) 26: 101-106 und Yanisch-Perron et al., Gene (1985) 33: 103-119). Als

20 Klonierwirte eignen sich besonders solche E. coli-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5αmcr, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die Selektion auf

25 Transformanten erfolgt in Gegenwart von Kanamycin. Die Plasmid-DNA der erhaltenen Transformanten wird anschließend sequenziert. Hierzu kann die von Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467) beschriebene Dideoxy-

30 Kettenabbruchmethode verwendet werden. Hiernach erhält man die stromaufwärts und stromabwärts des Tn5531-Insertionsortes thrE-Gensequenzen. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen werden dann mit kommerziell erhältlichen Sequenzanalyse-Programmen wie z. B. dem Programmpaket

35 Lasergene (Biocomputing Software for Windows, DNASTAR, Madison, USA) oder dem Programmpaket HUSAR (Release 4.0, EMBL, Heidelberg, Deutschland) analysiert und zusammengefügt.

Auf diese Weise wurde die neue für das thrE-Gen kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID NO 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen 5 Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID NO 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des thrE-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID NO 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind 10 ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID NO 1 oder Teilen von SEQ ID NO 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von 15 Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d. h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins 20 dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 25 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID NO 2 ergeben sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

30 Unter Ausnutzung der in SEQ-ID-No. 1 dargestellten Nukleotidsequenz können geeignete Primer synthetisiert und diese dann dazu verwendet werden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) thrE-Gene verschiedener coryneformer Bakterien und Stämme zu amplifizieren. Anleitungen hierzu 35 findet der Fachmann unter anderem beispielsweise im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: a practical approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und

Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994). Alternativ können die in SEQ-ID-No. 1 dargestellte Nukleotidsequenz oder Teile davon als Sonde zur Suche von thrE-Genen in Genbanken von insbesondere

5 coryneformen Bakterien verwendet werden. Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem beispielsweise im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al.

10 (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260) Die auf diese Weise amplifizierten thrE-Gen haltigen DNA-Fragmente werden anschließend kloniert und sequenziert.

Auf diese Weise wurde die in SEQ-ID-No. 3 dargestellte DNA-15 Sequenz des thrE-Gens des Stammes ATCC13032 erhalten, die ebenfalls Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. In SEQ-ID-No. 4 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz dargestellt.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren zur

20 Isolierung des thrE-Gens, dadurch gekennzeichnet, daß man als Indikatorstämme im thrE-Gen defekte Mutanten, vorzugsweise coryneformer Bakterien gewinnt, die auf einem ein Threonin-haltiges Oligopeptid enthaltenden Nährmedium nicht oder nur gering wachsen und

25 a) das thrE-Gen nach dem Anlegen einer Genbank identifiziert und isoliert, oder

b) im Fall der Transposon-Mutagenese auf das bevorzugt eine Antibiotikaresistenz enthaltende Transposon selektiert und so das thrE-Gen erhält.

30 Die Erfinder fanden heraus, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des thrE-Gens in verbesserter Weise L-Threonin produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die

Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des

5 Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Threonin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert.

10 Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin

15 eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei

20 Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EPS 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei

25 Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-30 229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Ein Beispiel für ein Plasmid mit Hilfe dessen das thrE-Gen

35 überexprimiert werden kann, ist pZ1thrE (Figur 2), das in dem Stamm DM368-2 pZ1thrE enthalten ist. Plasmid pZ1thrE ist ein auf Plasmid pZ1 beruhender C. glutamicum - E. coli

Pendelvektor, der bei Menkel et al. (Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554) beschrieben ist. Andere in *C. glutamicum* replizierbare Plasmidvektoren wie z.B. pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) 5 oder pZ8-1 (EP-B- 0 375 889) können in gleicher Weise verwendet werden.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Threonin vorteilhaft sein neben dem neuen *thrE*-Gen ein oder mehrere Enzyme des bekannten Threonin-Biosyntheseweges oder Enzyme 10 des anaplerotischen Stoffwechsels oder Enzyme des Zitronensäure-Zyklus zu überexprimieren. So kann beispielsweise:

- gleichzeitig das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende *hom*-Gen (Peoples et al., Molecular Microbiology 2, 63-72 (1988)) oder das für eine "feed back resistente" Homoserin-Dehydrogenase kodierende *hom^{dr}*-Allel (Archer et al., Gene 107, 53-59 (1991)) oder
- gleichzeitig das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende *pyc*-Gen (DE-A-19 831 609) oder
- gleichzeitig das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende *mgo*-Gen (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395 - 403 (1998))

überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Threonin 25 vorteilhaft sein neben der Überexpression des *thrE*-Gens unerwünschte Nebenreaktionen wie z. B. die Threonin-Dehydrogenase auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), 30 Academic Press, London, UK, 1982 und Bell und Turner, Biochemical Journal 156, 449-458 (1976)).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder

repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Threonin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1.

5 Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den 10 Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedenener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und 15 Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und 20 organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoffhaltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, 25 Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, 30 Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle 35 Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines

einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw.

- 5 Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem
- 10 Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise
- 15 bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt bis sich ein Maximum an L-Threonin gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse von L-Threonin kann durch

- 20 Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.
- 25

Folgende Mikroorganismen wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt:

- Brevibacterium flavum Stamm DM368-2 pZ1thrE
- 30 als DSM 12840
- Escherichia coli Stamm GM2929pCGL0040
- als DSM 12839

Beispiele

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) durchgeführt. Die Transformation von *Escherichia coli* wurde, wenn nicht anders beschrieben, nach Chung et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1989) 86: 2172-2175) durchgeführt.

Beispiel 1

Klonierung und Sequenzierung des *thrE*-Gens von *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752

1. Transposonmutagenese und Mutantenauswahl

Der Stamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752ΔilvA wurde einer Mutagenese mit dem Transposon Tn5531 unterworfen, dessen Sequenz unter der Accession-Nummer U53587 in der Nukleotid-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (Bethesda, USA) hinterlegt ist. Der Einbau einer Deletion in das *ilvA*-Gen von *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752 wurde mit dem bei Schäfer et al. (Gene (1994) 145: 69-73) beschriebenen System zum Genaustausch durchgeführt. Dazu wurde der von Sahm et al. konstruierte Inaktivierungsvektor pK19mobsacBΔilvA (Applied and Environmental Microbiology (1999) 65: 1973-1979) zur Deletion verwendet. Zunächst wurde der Methylase-defekte *Escherichia coli* Stamm SCS110 (Jerpseth und Kretz, STRATEGIES in molecular biology 6, 22, (1993)) der Firma Stratagene (Heidelberg, Deutschland) mit 200 ng des Vektors pK19mobsacBΔilvA transformiert. Transformanten wurden anhand ihrer Kanamycinresistenz auf 50 µg/mL Kanamycin enthaltenden LB-Agarplatten identifiziert. Aus einer der

Transformanten wurde das Plasmid pK19mobsacB Δ ilvA präpariert. Mittels Elektroporation (Haynes et al., FEMS Microbiology Letters (1989) 61: 329-334) wurden dieses Inaktivierungsplasmid dann in den Stamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752 eingebracht. Klone, bei denen der Inaktivierungsvektor im Genom integriert vorlag, wurden anhand ihrer Kanamycinresistenz auf 15 μ g/mL Kanamycin enthaltenden LBHIS-Agarplatten identifiziert (Liebl et al., FEMS Microbiology Letters (1989) 65: 299-304). Um auf die Excision des Vektors zu selektieren, wurden Kanamycin-resistente Klone auf Saccharose-haltigem LBG-Medium (LB-Medium mit 15 g/L Agar, 2% Glukose und 10% Saccharose) ausplattiert. Dabei wurden Kolonien erhalten, welche den Vektor durch ein zweites Rekombinationsereignis wieder verloren haben (Jäger et al.; Journal of Bacteriology (1992) 174: 5462-5465). Durch Überimpfen auf Minimalmediumplatten (CGXII-Medium mit 15 g/L Agar (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology (1993) 175: 5595-5603)) mit und ohne 300 mg/L L-Isoleucin, bzw. mit und ohne 50 μ g/mL Kanamycin wurden sechs Klone isoliert, die durch Excision des Vektors Kanamycin sensitiv und Isoleucin auxotroph waren und bei denen nun das unvollständige ilvA-Gen (Δ ilvA-Allel) im Genom vorlag. Einer dieser Klone wurde als Stamm ATCC14752 Δ ilvA bezeichnet und zur Transposonmutagenese eingesetzt.

Aus dem Methylase-defekten *E. coli*-Stamm GM2929pCGL0040 (*E. coli* GM2929: Palmer et al., Gene (1994) 143: 1-12) wurde das Plasmid pCGL0040 isoliert, welches das zusammengesetzte Transposon Tn5531 enthält (Ankri et al., Journal of Bacteriology (1996) 178: 4412-4419). Der Stamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752 Δ ilvA wurde mittels Elektroporation (Haynes et al., FEMS Microbiology Letters (1989) 61: 329-334) mit dem Plasmid pCGL0040 transformiert. Klone, bei denen das Transposon Tn5531 ins Genom integriert war, wurden anhand ihrer Kanamycinresistenz auf 15 μ g/mL Kanamycin enthaltenden LBHIS-Agarplatten identifiziert (Liebl et al., FEMS Microbiology Letters (1989) 65: 299-304). Auf diese Weise wurden 2000 Klone erhalten, welche

auf verzögertes Wachstum in Anwesenheit von Threonyl-threonyl-threonin überprüft wurden. Dazu wurden alle Klone einzeln auf CGXII-Minimalmedium-Agarplatten mit und ohne 2 mM Threonyl-threonyl-threonin übertragen. Das Medium war 5 identisch mit dem bei Keilhauer et al. beschriebenen Medium CGXII (Journal of Bacteriology (1993) 175: 5593-5603), enthielt aber zusätzlich 25 µg/mL Kanamycin, 300 mg/L L-Isoleucin und 15 g/L Agar. Die Zusammensetzung des von Keilhauer et al. beschriebenen Mediums ist in Tabelle 1 10 dargestellt.

Tabelle 1
Zusammensetzung des Mediums CGXII

Komponente	Konzentration
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20 g/L
Harnstoff	5 g/L
KH_2PO_4	1 g/L
K_2HPO_4	1 g/L
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,25 g/L
3-Morpholinopropansulfonsäure	42 g/L
CaCl_2	10 mg/L
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1 mg/L
CuSO_4	0,2 mg/L
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,02 mg/L
Biotin	0,2 mg/L
Glukose	40 g/L
Protokatechusäure	30 mg/L

Die Agarplatten wurden bei 30°C inkubiert und das Wachstum 15 nach 12, 18 und 24 Stunden untersucht. Es wurde eine Transposonmutante erhalten, die ohne Threonyl-threonyl-threonin vergleichbar mit dem Ausgangsstamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752ΔilvA wuchs, in Anwesenheit von 2 mM Threonyl-threonyl-threonin aber verzögertes Wachstum

zeigte. Diese wurde als ATCC14752ΔilvAthrE::Tn5531 bezeichnet.

2. Klonierung und Sequenzierung des Insertionsortes von Tn5531 in ATCC14752ΔilvAthrE::Tn5531

5 Um den stromaufwärts des Transposons Tn5531 gelegenen Insertionsort in der in Beispiel 1.1 beschriebenen Mutante zu klonieren, wurde zunächst die chromosomale DNA dieses Mutantenstammes wie bei Schwarzer et al. (Bio/Technology (1990) 9: 84-87) beschrieben isoliert und 400 ng davon mit 10 der Restriktionsendonuklease EcoRI geschnitten. Der vollständige Restriktionsansatz wurde in den ebenfalls mit EcoRI linearisierten Vektor pUC18 (Norander et al., Gene (1983) 26: 101-106) der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) ligiert. Mit dem gesamten Ligationsansatz 15 wurde der E. coli Stamm DH5 α mcr (Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1990) 87: 4645-4649) mittels Elektroporation transformiert (Dower et al., Nucleic Acid Research (1988) 16: 6127-6145). Transformanten, bei denen auf dem Vektor 20 pUC18 die Insertionsorte des Transposons Tn5531 kloniert vorlagen, wurden anhand ihrer Carbenicillin- und Kanamycinresistenz auf 50 μ g/mL Carbenicillin und 25 μ g/mL Kanamycin enthaltenden LB-Agarplatten identifiziert. Aus drei der Transformanten wurden die Plasmide präpariert und 25 durch Restriktionsanalyse die Größen der klonierten Inserts bestimmt. Die Nukleotidsequenz des Insertionsortes auf einem der Plasmide mit einem ca. 5,7 kb großen Insert wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. bestimmt (Proceedings of the National Academy of Sciences 30 of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467). Hierzu wurden 2,2 kb des Inserts ausgehend von folgendem Oligonukleotid-Primer sequenziert: 5'-CGG GTC TAC ACC GCT AGC CCA GG-3'.

Zur Identifizierung des stromabwärts des Transposons 35 gelegenen Insertionsortes wurde die chromosomale DNA der Mutante mit der Restriktionsendonuklease XbaI geschnitten

und in den mit XbaI linearisierten Vektor pUC18 ligiert. Die weitere Klonierung wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Nukleotidsequenz des Insertionsortes auf einem der Plasmide mit einem ca. 8,5 kb großen Insert wurde 5 nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. bestimmt (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467). Hierzu wurden 0,65 kb des Inserts ausgehend von folgendem Oligonukleotid-Primer sequenziert: 5'-CGG TGC CTT ATC CAT 10 TCA GG-3'.

Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurde mit dem Programm Paket Lasergene (Biocomputing Software for Windows, DNASTAR, Madison, USA) analysiert und zusammengefügt. Diese Nukleotidsequenz ist als SEQ ID NO 1 wiedergegeben. Die 15 Analyse ergab die Identifizierung eines offenen Leserasters von 1467 bp Länge. Das entsprechende Gen wurde als thrE-Gen bezeichnet. Das dazugehörige Genprodukt umfasst 489 Aminosäuren und ist als SEQ ID NO 2 wiedergegeben.

20 Beispiel 2

Klonierung und Sequenzierung des Gens thrE aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

Das Gen thrE wurde in den *E. coli* Klonierungsvektor pUC18 (Norrrander et al., Gene (1983) 26: 101-106, Roche 25 Diagnostics, Mannheim, Deutschland) kloniert. Die Klonierung wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurde durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) das Gen aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 mittels folgender aus SEQ ID NO 1 abgeleiteter Oligonukleotid-Primer 30 amplifiziert.

thrE-forward:

5'-CCC CTT TGA CCT GGT GTT ATT G-3'

thrE-reverse:

5'-CGG CTG CGG TTT CCT CTT-3'

Die PCR-Reaktion wurde in 30 Zyklen in Gegenwart von 200 μ M Deoxynukleotid-triphosphaten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 1 μ M des entsprechenden Oligonukleotids, 100 ng chromosomaler
5 DNA von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, 1/10 Volumen
10-fach Reaktionspuffer und 2,6 Einheiten einer
hitzestabilen Taq-/Pwo-DNA-Polymerase-Mischung (Expand High
Fidelity PCR System der Firma Roche Diagnostics, Mannheim,
Deutschland) in einem Thermocycler (PTC-100, MJ Research,
10 Inc., Watertown, USA) unter folgenden Bedingungen
durchgeführt: 94°C für 30 Sekunden, 58°C für 30 Sekunden
und 72°C für 2 Minuten.

Das amplifizierte etwa 1,9 kb große Fragment wurde dann im
folgenden mit Hilfe des SureClone Ligation Kit (Amersham
15 Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) nach Angaben des
Herstellers in die SmaI-Schnittstelle des Vektors pUC18
ligiert. Mit dem gesamten Ligationsansatz wurde der *E. coli*
Stamm DH5 α mcr (Grant et al., Proceedings of the National
Academy of Sciences of the United States of America USA
20 (1990) 87: 4645-4649) transformiert. Transformanten wurden
anhand ihrer Carbenicillinresistenz auf 50 μ g/mL
Carbenicillin enthaltenden LB-Agarplatten identifiziert.
Aus 8 der Transformanten wurden die Plasmide präpariert und
durch Restriktionsanalyse auf das Vorhandensein des 1,9 kb
25 PCR-Fragments als Insert überprüft. Das so entstandene
rekombinante Plasmid wird im folgenden mit pUC18thrE
bezeichnet.

Die Nukleotidsequenz des 1,9 kb PCR-Fragments in Plasmid
pUC18thrE wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von
30 Sanger et al. bestimmt (Proceedings of the National Academy
of Sciences of the United States of America USA (1977) 74:
5463-5467). Hierzu wurde das vollständige Insert von
pUC18thrE mit Hilfe folgender Primer der Firma Roche
Diagnostics (Mannheim, Deutschland) sequenziert.
35 Universalprimer:

5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'

Reverseprimer:

5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'

Die Nukleotidsequenz ist als SEQ ID NO 3 wiedergegeben. Die
5 erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit dem Programm Paket
Lasergene (Biocomputing Software for Windows, DNASTAR,
Madison, USA) analysiert. Die Analyse ergab die
Identifizierung eines offenen Leserasters von 1467 bp
Länge, das als thrE-Gen bezeichnet wurde. Dieses kodiert
10 für ein Polypeptid von 489 Aminosäuren, welches als SEQ ID
NO 4 wiedergegeben ist.

Beispiel 3

Expression des Gens thrE in *Corynebacterium glutamicum*

15 Das unter Beispiel 2 beschriebene Gen thrE aus
Corynebacterium glutamicum ATCC13032 wurde zur Expression
in den Vektor pZ1 kloniert (Menkel et al., Applied and
Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554). Dazu wurde
aus dem Plasmid pUC18thrE mit den Restriktionsenzymen SacI
20 und XbaI ein 1881 bp großes, das Gen thrE enthaltendes DNA-
Fragment ausgeschnitten. Die 5'- und 3'-Enden dieses
Fragments wurden mit Klenow-Enzym behandelt. Das
resultierende DNA-Fragment wurde in den zuvor mit ScaI
linearisierten und dephosphorylierten Vektor pZ1 ligiert.
25 Mit dem gesamten Ligationsansatz wurde der *E. coli* Stamm
DH5 α mcr (Grant et al., Proceedings of the National Academy
of Sciences of the United States of America USA (1990) 87:
4645-4649) transformiert. Transformanten wurden anhand
ihrer Kanamycinresistenz auf 50 μ g/mL Kanamycin
30 enthaltenden LB-Agarplatten identifiziert. Aus 2
Transformanten wurden die Plasmide präpariert und durch
Restriktionsanalyse auf das Vorhandensein des 1881 bp
ScaI/XbaI-Fragments als Insert überprüft. Das auf diese

Weise entstandene rekombinante Plasmid wurde als pZ1thrE bezeichnet (Figur 2).

Mittels Elektroporation (Haynes et al., FEMS Microbiology Letters (1989) 61: 329-334) wurden die Plasmide pZ1 und 5 pZ1thrE in den threoninbildenden Stamm *Brevibacterium flavum* DM368-2 eingebracht. Der Stamm DM368-2 ist in der EP-B-0 385 940 beschrieben und als DSM5399 hinterlegt. Transformanten wurden anhand ihrer Kanamycinresistenz auf 10 15 µg/mL Kanamycin enthaltenden LBHIS-Agarplatten identifiziert (Liebl et al., FEMS Microbiology Letters (1989) 65: 299-304). Auf diese Weise entstanden die Stämme *Brevibacterium flavum* DM368-2 pZ1 und DM368-2 pZ1thrE.

Beispiel 5

15 Herstellung von L-Threonin mit *Brevibacterium flavum*

Zur Untersuchung ihrer Threoninbildung wurden die Stämme *B. flavum* DM368-2 pZ1 und DM368-2 pZ1thrE in 100 mL Brain Heart Infusion-Medium mit 50 µg Kanamycin/mL (Difco Laboratories, Detroit, USA) für 14 Stunden bei 30°C 20 vorkultiviert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 0,9% (w/v) Natriumchloridlösung gewaschen und mit dieser Suspension je 60 mL CgXII-Medium so angeimpft, daß die OD₆₀₀ (optische Dichte bei 600 nm) 0,5 betrug. Das Medium war identisch mit dem bei Keilhauer et al. beschriebenen Medium 25 (Journal of Bacteriology (1993) 175: 5593-5603), enthielt aber zusätzlich 50 µg Kanamycin pro mL. Die Kultivierung beider Stämme wurde bei 30°C über einen Zeitraum von 72 Stunden durchgeführt. Nach 0, 24, 48 und 72 Stunden wurden jeweils Proben genommen und die Zellen kurz abzentrifugiert 30 (5 Minuten bei 13000 Umdrehungen pro Minute mit einer Biofuge pico der Firma Heraeus, Osterode, Deutschland).

Die quantitative Bestimmung der extrazellulären Aminosäurekonzentrationen aus dem Kulturüberstand erfolgte mittels reversed phase HPLC (Lindroth et al., Analytical

- Figur 1: Karte des das Transposon Tn5531 enthaltenden Plasmids pCGL0040. Das Transposon ist als nicht schraffierter Pfeil gekennzeichnet.
- Figur 2: Karte des das thrE-Gen enthaltenden Plasmids pZ1thrE.

5 Längenangaben sind als ca.-Angaben aufzufassen. Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung:

- BglIII: Restriktionsendonuklease aus *Bacillus globigii*
- 10 • EcoRI: Restriktionsendonuklease aus *Escherichia coli*
- EcoRV: Restriktionsendonuklease aus *Escherichia coli*
- SacI: Restriktionsendonuklease aus *Streptomyces achromogenes*
- XbaI: Restriktionsendonuklease aus *Xanthomonas badrii*
- 15 • XhoI: Restriktionsendonuklease aus *Xanthomonas holcicola*
- Amp: Ampicillinresistenzgen
- Kan: Kanamycinresistenzgen
- 'amp: 3'-Teil des Ampicillinresistenzgens
- oriBR322: Replikationsregion des Plasmides pBR322

chemistry (1979) 51: 1167-1174). Es wurde ein HPLC-Gerät der Serie HP1100 (Hewlett-Packard, Waldbronn, Deutschland) mit angeschlossenem Fluoreszenzdetektor (G1321A) verwendet; die Systemsteuerung und die Auswertung der Daten erfolgte 5 mit einer HP-Chem-Station (Hewlett-Packard). 1 µL der zu analysierenden Aminosäurelösung wurde in einer automatischen Vorsäulenderivatisierung mit 20 µL ortho-Phthalaldehyd/2-Mercaptoethanol-Fertigreagenz (Pierce Europe BV, Oud-Beijerland, Niederlande) gemischt. Die dabei 10 entstehenden fluoreszierenden, thiosubstituierten Isoindole (Jones et al., Journal of Chromatography (1983) 266: 471-482) wurden über eine kombinierte Vorsäule (40x4 mm Hypersil ODS 5) und Hauptsäule (Hypersil ODS 5, beide Säulen von der Firma CS-Chromatographie Service GmbH, 15 Langerwehe, Deutschland) mit einem Gradientenprogramm mit zunehmend unpolarer Phase (Methanol) aufgetrennt. Das polare Eluent war Natriumacetat (0,1 Molar, pH 7,2); die Flußrate betrug 0,8 mL pro Minute. Die Fluoreszenzdetektion der derivatisierten Aminosäuren erfolgte bei einer 20 Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Die Aminosäurekonzentrationen wurden über einen Vergleich mit einem externen Standard und Asparagin als zusätzlichem internen Standard berechnet.

25 Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2:

Stamm	L-Threonin (g/L)			
	0 Std.	24 Std.	48 Std.	72 Std.
DM368-2 pZ1	0	0,46	1,27	1,50
DM368-2 pZ1thrE	0	0,68	1,71	2,04

Folgende Figuren sind beigefügt:

**Neue für das thrE-Gen codierende Nukleotidsequenzen und
Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Threonin mit
coryneformen Bakterien**

Patentansprüche

- 5 1. In coryneformen Mikroorganismen replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA mit der Herkunft *Corynebacterium*, die zumindest eine Nukleotidsequenz enthält, die für das thrE-Gen codiert.
- 10 2. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 1 mit
 - 10 (i) den Nukleotidsequenzen, gezeigt in SEQ-ID-No. 1, oder SEQ-ID No. 3, die für das thrE-Gen codieren, oder
 - 15 (ii) mindestens einer Sequenz, die den Sequenzen (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder
 - 20 (iii) mindestens einer Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und/oder gegebenenfalls (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).
- 25 3. Aminosäuresequenz des Proteins, abgeleitet aus den Nukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1 oder 2, dargestellt in der SEQ-ID-No. 2 und der SEQ-ID-No. 4.
4. Coryneforme Mikroorganismen, insbesondere der Gattung *Corynebacterium*, transformiert durch die Einführung einer oder mehrerer der replizierbaren DNA gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2.
- 25 5. *Corynebacterium glutamicum* DM368-2 pZ1thrE, hinterlegt unter der Nummer DSM 12840.
- 30 6. Verfahren zur Herstellung von L-Threonin durch Fermentation coryneformer Bakterien, dadurch gekennzeichnet,

daß man Bakterien einsetzt, in denen Nukleotidsequenzen, codierend für das thrE-Gen, verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

7. Verfahren gemäß Anspruch 6,
5 dadurch gekennzeichnet,
daß man Bakterien einsetzt, in denen zusätzlich eines
oder mehrere Gene des Threonin-Biosyntheseweges
verstärkt.
8. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 und 7,
10 dadurch gekennzeichnet,
daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten
Stamm einsetzt und der Plasmidvektor die für das thrE-
Gen codierende Nucleotidsequenz trägt.
9. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 8,
15 dadurch gekennzeichnet,
daß man das thrE-Gen in Mikroorganismen überexprimiert,
die weitere Metabolit- bzw. Antimetabolit-
Resistenzmutationen aufweisen.
10. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 9,
20 dadurch gekennzeichnet,
daß man die Mikroorganismen zur Erzielung der
Überexpression in geänderten Kulturmedien fermentiert
und/oder die Fermentationsführung ändert.
11. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 10,
25 dadurch gekennzeichnet,
daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen die
Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet
sind, die die Threoninbildung verringern.
12. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 11,
30 dadurch gekennzeichnet,
daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man
zusätzlich zum thrE-Gen die übrigen Gene des
Stoffwechselweges der Threoninbildung, einzeln oder
gemeinsam verstärkt (überexprimiert).

13. Verfahren zur Herstellung von L-Threonin,
dadurch gekennzeichnet,
daß man folgende Schritte durchführt:

5 a) Fermentation von Mikroorganismen gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, in denen zumindest das thrE-Gen verstärkt (überexprimiert) wird, ggf. in Kombination mit weiteren Genen,
10 b) Anreicherung des L-Threonins im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen, und
15 c) Isolieren des L-Threonins.

14. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
15 daß man Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium einsetzt.

15. Verfahren zur Isolierung des thrE-Gens,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als Indikatorstämme im thrE-Gen defekte
20 Mutanten, vorzugsweise coryneformer Bakterien gewinnt,
die auf einem ein Threonin-haltiges Oligopeptid
enthaltenden Nährmedium nicht oder nur gering wachsen
und
25 a) das thrE-Gen nach dem Anlegen einer Genbank
identifiziert und isoliert, oder
b) im Fall der Transposon-Mutagenese auf das bevorzugt
eine Antibiotikaresistenz enthaltende Transposon
selektiert und so das thrE-Gen erhält.

Zusammenfassung

**Neue für das thrE-Gen codierende Nukleotidsequenzen und
Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Threonin mit
coryneformen Bakterien**

5 15. Die Erfindung betrifft in coryneformen Mikroorganismen
replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA mit der
Herkunft Corynebacterium, die zumindest eine
Nukleotidsequenz entält, die für das thrE-Gen codiert,
und ein Verfahren zur Herstellung von L-Threonin, das
dadurch gekennzeichnet ist, daß man folgende Schritte
10 durchführt:

15 a) Fermentation von Mikroorganismen in denen zumindest
das thrE-Gen verstärkt (überexprimiert)
wird, ggf. in Kombination mit weiteren Genen,
b) Anreicherung des L-Threonins im Medium oder in den
Zellen der Mikroorganismen, und
c) Isolieren des L-Threonins.

Figure 1:

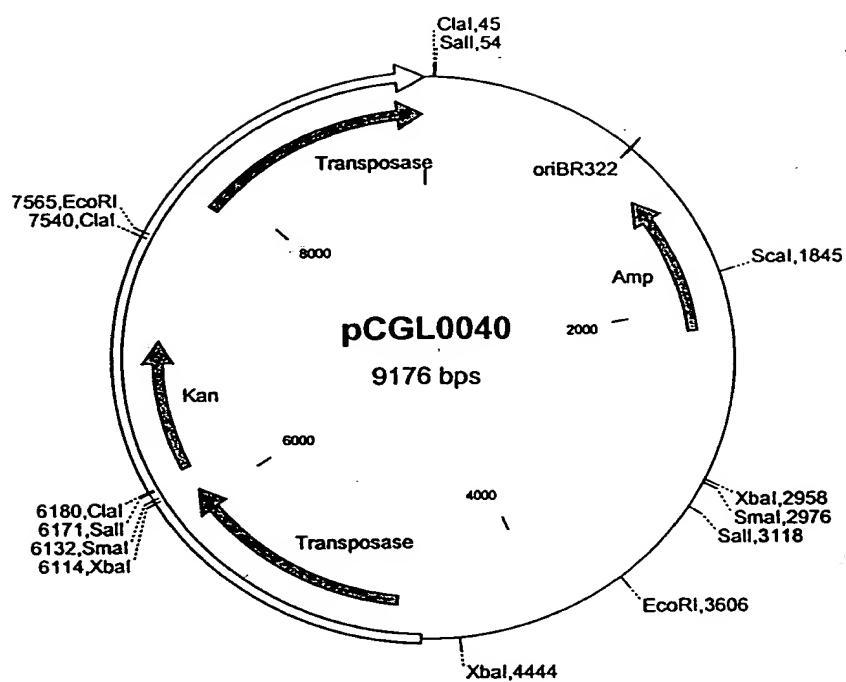
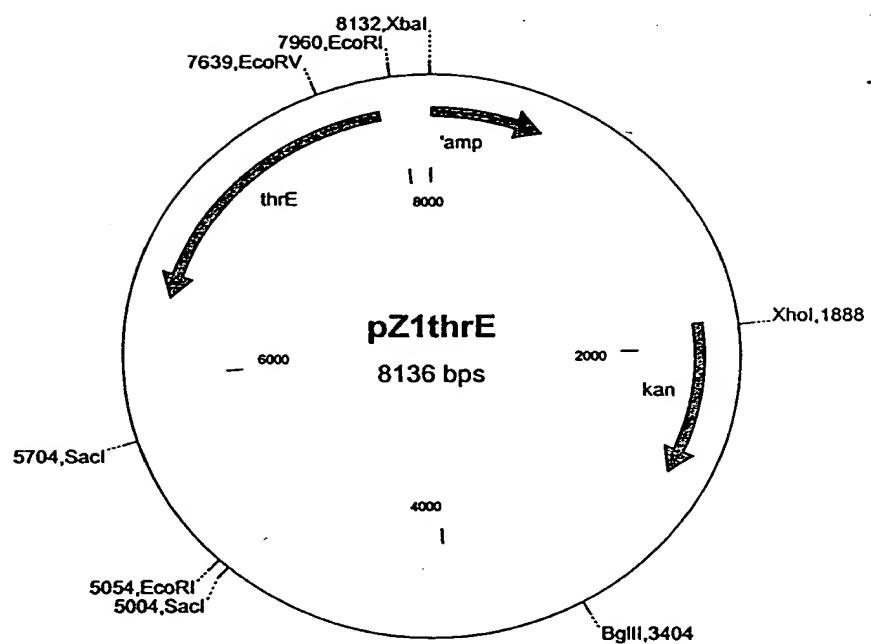


Figure 2:



26

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG
Forschungszentrum-Jülich GmbH

5' <120> Neue für das thrE-Gen codierende Nukleotidsequenzen und Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Threonin mit coryneformen Bakterien.

10 <130> 990079 BT

<140>
<141>

15 <160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

20 <210> 1
20 <211> 2817

<212> DNA
<213> *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752

25 <220>
<221> CDS
<222> (398)..(1864)
<223> thrE-Gen

45 ctt cgt ggc cgc att tca aca gtt gac gct gca aaa gcc gca cct ccg 463
 Leu Arg Gly Arg Ile Ser Thr Val Asp Ala Ala Lys Ala Ala Pro Pro
 10 15 20

```

50  cca tcg cca cta gcc ccg att gat ctc act gac cat agt caa gtg gcc 511
    Pro Ser Pro Leu Ala Pro Ile Asp Leu Thr Asp His Ser Gln Val Ala
                    25           30           35

```

55 ggt gtg atg aat ttg gct gcg aga att ggc gat att ttg ctt tct tca 559
 Gly Val Met Asn Leu Ala Ala Arg Ile Gly Asp Ile Leu Leu Ser Ser
 40 45 50

60	ggt acg tca aac agt gat acc aag gtg caa gtt cga gcg gtg acc tct	607
	Gly Thr Ser Asn Ser Asp Thr Lys Val Gln Val Arg Ala Val Thr Ser	
65	60	65
70	55	70
	...	

gct tat ggc ctg tac tat acg cat gtg gat atc acg ttg aat acg atc 655
Ala Tyr Gly Leu Tyr Thr His Val Asp Ile Thr Leu Asn Thr Ile
75 80 85

65

19971 U.S. PRO
09/963521

acc atc ttc acc aac atc ggt gtg gag agg aag atg ccg gtc aac gtg	703
Thr Ile Phe Thr Asn Ile Gly Val Glu Arg Lys Met Pro Val Asn Val	
90 95 100	
5 ttt cat gtt gtc ggc aag ttg gac acc aac ttc tcc aaa ctg tct gag	751
Phe His Val Val Gly Lys Leu Asp Thr Asn Phe Ser Lys Leu Ser Glu	
105 110 115	
10 gtt gac cgt ttg atc cgt tcc att cag gct ggt gct acc ccg cct gag	799
Val Asp Arg Leu Ile Arg Ser Ile Gln Ala Gly Ala Thr Pro Pro Glu	
120 125 130	
15 gtt gcc gag aaa att ctg gac gag ttg gag caa tcg cct gcg tct tat	847
Val Ala Glu Lys Ile Leu Asp Glu Leu Glu Gln Ser Pro Ala Ser Tyr	
135 140 145 150	
20 ggt ttc cct gtt gcg ttg ctt ggc tgg gca atg atg ggt ggc gct gtt	895
Gly Phe Pro Val Ala Leu Leu Gly Trp Ala Met Met Gly Gly Ala Val	
155 160 165	
25 gct gtg ctg ttg ggt gga tgg cag gtt tcc cta att gct ttt att	943
Ala Val Leu Leu Gly Gly Trp Gln Val Ser Leu Ile Ala Phe Ile	
170 175 180	
30 ttg cct act ttc ttc caa aat gtt gtt ggt ttt att gcc acg ctg	1039
Leu Pro Thr Phe Phe Gln Asn Val Val Gly Phe Ile Ala Thr Leu	
200 205 210	
35 cct gca tcg att gct tat tct ttg gcg ttg caa ttt ggt ctt gag atc	1087
Pro Ala Ser Ile Ala Tyr Ser Leu Ala Leu Gln Phe Gly Leu Glu Ile	
215 220 225 230	
40 aaa ccg agc cag atc atc gca tct gga att gtt gtg ctg ttg gca ggt	1135
Lys Pro Ser Gln Ile Ile Ala Ser Gly Ile Val Val Leu Leu Ala Gly	
235 240 245	
45 ttg aca ctt gtg caa tct ctg cag gac ggc atc acg ggc gct ccg gtg	1183
Leu Thr Leu Val Gln Ser Leu Gln Asp Gly Ile Thr Gly Ala Pro Val	
250 255 260	
50 gtt gct ggc gtg ggt ttg ggc att cag ctt tct gaa atc ttg cat gtc	1279
Val Ala Gly Val Gly Leu Gly Ile Gln Leu Ser Glu Ile Leu His Val	
280 285 290	
55 atg ttg cct gcc atg gag tcc gct gca gca cct aat tat tcg tct aca	1327
Met Leu Pro Ala Met Glu Ser Ala Ala Pro Asn Tyr Ser Ser Thr	
295 300 305 310	
60 ttc gcc cgc att atc gct ggt ggc gtc acc gca gcg gcc ttc gca gtg	1375
Phe Ala Arg Ile Ile Ala Gly Gly Val Thr Ala Ala Ala Phe Ala Val	
315 320 325	
ggt tgt tac gcg gag tgg tcc tcg gtg att att gcg ggg ctt act gcg	1423
Gly Cys Tyr Ala Glu Trp Ser Ser Val Ile Ile Ala Gly Leu Thr Ala	
330 335 340	

ctg atg ggt tct gcg ttt tat tac ctc ttc gtt tat tta ggc ccc	1471
Leu Met Gly Ser Ala Phe Tyr Tyr Leu Phe Val Val Tyr Leu Gly Pro	
345 350 355	
5 gtc tct gcc gct gcg att gct gca aca gca gtt ggt ttc act ggt ggt	1519
Val Ser Ala Ala Ala Ile Ala Ala Thr Ala Val Gly Phe Thr Gly Gly	
360 365 370	
10 ttg ctt gcc cgt cga ttc ttg att cca ccg ttg att gtg gcg att gcc	1567
Leu Leu Ala Arg Arg Phe Leu Ile Pro Pro Leu Ile Val Ala Ile Ala	
375 380 385 390	
15 ggc atc aca cca atg ctt cca ggt cta gca att tac cgc gga atg tac	1615
Gly Ile Thr Pro Met Leu Pro Gly Leu Ala Ile Tyr Arg Gly Met Tyr	
395 400 405	
20 gcc acc ttg aat gat caa aca ctc atg ggt ttc acc aac att gcg gtt	1663
Ala Thr Leu Asn Asp Gln Thr Leu Met Gly Phe Thr Asn Ile Ala Val	
410 415 420	
25 gct tta gcc act gct tca tca ctt gcc gct ggc gtg gtt ttg ggt gag	1711
Ala Leu Ala Thr Ala Ser Ser Leu Ala Ala Gly Val Val Leu Gly Glu	
425 430 435	
30 tgg att gcc cgc agg cta cgt cgt cca cca cgc ttc aac cca tac cgt	1759
Trp Ile Ala Arg Arg Leu Arg Arg Pro Pro Arg Phe Asn Pro Tyr Arg	
440 445 450	
35 gca ttt acc aag gcg aat gag ttc tcc ttc cag gag gaa gct gag cag	1807
Ala Phe Thr Lys Ala Asn Glu Phe Ser Phe Gln Glu Glu Ala Glu Gln	
455 460 465 470	
40 aat cag cgc cgg cag aga aaa cgt cca aag act aat caa aga ttc ggt	1855
Asn Gln Arg Arg Gln Arg Lys Arg Pro Lys Thr Asn Gln Arg Phe Gly	
475 480 485	
45 aat aaa agg taaaaatcaa cctgcttagg cgtcttcgc ttaaatagcg	1904
Asn Lys Arg	
50 tagaatatcg ggtcgatcgc ttttaaacac tcaggaggat ccttgcggc caaaatcag	1964
gacactcgac ccacccaga atcccttac gctgttgaag agggaaaccgc agccggtgcc	2024
55 cgcaggattt ttgccaccta ttcttaaggac ttcttcgacg gcgtcacttt gatgtgcac	2084
ctcggcggtt aacctcaggc cctgcgttac accaaggctcg cttctgaaca cgaggaagct	2144
cagccaaaga aggctacaaa gcggactcgt aaggcaccag ctaagaaggc tgctgctaag	2204
50 aaaacgacca agaagaccac taagaaaaact actaaaaaaga ccaccgcaaa gaagaccaca	2264
aagaagtctt aagccggatc ttatatggat gattccaata gctttgttagt tggcgttac	2324
55 cgtctgccag tggatatgac tgtccaccca gatggtagct atagcatctc ccccgcccc	2384
ggtgtggcttgc tcacggggct ttcccccggt ctggacaac atcgtggatg ttgggtcgga	2444
tggcctggaa ctgttagatgt tgcacccgaa ccatttcgaa cagatacggg tggtttgttg	2504
60 caccctgttg tcctcaactgc aagtgactat gaaggcttct acgagggtt ttcaaacgc	2564
acgctgtggc ctctttcca cgatttgatt gttactccgg tgtacaacac cgattgggtgg	2624
65 catgcgttcc gggaaagtaaa cctcaagttc gctgaagccg tgagccaagt ggccggcacac	2684

ggtgccactg tgtgggtgca ggactatcatcag ctgttgctgg ttcctggcat tttgcgccag 2744
 atgcgcctg atttgaagat cggtttcttc ctccacattc cttcccttc ccctgatctg 2804
 5 ttccgtcagc tgc 2817

10 <210> 2
 <211> 489
 <212> PRT
 <213> *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752

15 <400> 2
 Met Leu Ser Phe Ala Thr Leu Arg Gly Arg Ile Ser Thr Val Asp Ala
 1 5 10 15
 Ala Lys Ala Ala Pro Pro Pro Ser Pro Leu Ala Pro Ile Asp Leu Thr
 20 25 30
 20 Asp His Ser Gln Val Ala Gly Val Met Asn Leu Ala Ala Arg Ile Gly
 35 40 45
 25 Asp Ile Leu Leu Ser Ser Gly Thr Ser Asn Ser Asp Thr Lys Val Gln
 50 55 60
 Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Tyr Gly Leu Tyr Tyr Thr His Val Asp
 65 70 75 80
 30 Ile Thr Leu Asn Thr Ile Thr Ile Phe Thr Asn Ile Gly Val Glu Arg
 85 90 95
 Lys Met Pro Val Asn Val Phe His Val Val Gly Lys Leu Asp Thr Asn
 100 105 110
 35 Phe Ser Lys Leu Ser Glu Val Asp Arg Leu Ile Arg Ser Ile Gln Ala
 115 120 125
 40 Gly Ala Thr Pro Pro Glu Val Ala Glu Lys Ile Leu Asp Glu Leu Glu
 130 135 140
 Gln Ser Pro Ala Ser Tyr Gly Phe Pro Val Ala Leu Leu Gly Trp Ala
 145 150 155 160
 45 Met Met Gly Gly Ala Val Ala Val Leu Leu Gly Gly Gly Trp Gln Val
 165 170 175
 Ser Leu Ile Ala Phe Ile Thr Ala Phe Thr Ile Ile Ala Thr Thr Ser
 180 185 190
 50 Phe Leu Gly Lys Lys Gly Leu Pro Thr Phe Phe Gln Asn Val Val Gly
 195 200 205
 55 Gly Phe Ile Ala Thr Leu Pro Ala Ser Ile Ala Tyr Ser Leu Ala Leu
 210 215 220
 Gln Phe Gly Leu Glu Ile Lys Pro Ser Gln Ile Ile Ala Ser Gly Ile
 225 230 235 240
 60 Val Val Leu Leu Ala Gly Leu Thr Leu Val Gln Ser Leu Gln Asp Gly
 245 250 255
 Ile Thr Gly Ala Pro Val Thr Ala Ser Ala Arg Phe Phe Glu Thr Leu
 260 265 270

Leu Phe Thr Gly Gly Ile Val Ala Gly Val Gly Leu Gly Ile Gln Leu
 275 280 285

5 Ser Glu Ile Leu His Val Met Leu Pro Ala Met Glu Ser Ala Ala Ala
 290 295 300

Pro Asn Tyr Ser Ser Thr Phe Ala Arg Ile Ile Ala Gly Gly Val Thr
 305 310 315 320

10 Ala Ala Ala Phe Ala Val Gly Cys Tyr Ala Glu Trp Ser Ser Val Ile
 325 330 335

Ile Ala Gly Leu Thr Ala Leu Met Gly Ser Ala Phe Tyr Tyr Leu Phe
 340 345 350

15 Val Val Tyr Leu Gly Pro Val Ser Ala Ala Ala Ile Ala Ala Thr Ala
 355 360 365

Val Gly Phe Thr Gly Gly Leu Leu Ala Arg Arg Phe Leu Ile Pro Pro
 20 370 375 380

Leu Ile Val Ala Ile Ala Gly Ile Thr Pro Met Leu Pro Gly Leu Ala
 385 390 400

25 Ile Tyr Arg Gly Met Tyr Ala Thr Leu Asn Asp Gln Thr Leu Met Gly
 405 410 415

Phe Thr Asn Ile Ala Val Ala Leu Ala Thr Ala Ser Ser Leu Ala Ala
 420 425 430

30 Gly Val Val Leu Gly Glu Trp Ile Ala Arg Arg Leu Arg Arg Pro Pro
 435 440 445

Arg Phe Asn Pro Tyr Arg Ala Phe Thr Lys Ala Asn Glu Phe Ser Phe
 35 450 455 460

Gln Glu Glu Ala Glu Gln Asn Gln Arg Arg Gln Arg Lys Arg Pro Lys
 465 470 475 480

40 Thr Asn Gln Arg Phe Gly Asn Lys Arg
 485

45 <210> 3
 <211> 1909
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

50 <220>
 <221> CDS
 <222> (280)..(1746)
 <223> thrE-Gen

55 <400> 3
 agcttgcatt cctgcaggc gactctagag gatccccccc ctttgacctg gtgttattga 60
 gctggagaag agacttgaac tctcaaccta cgcattacaa gtgcgttgcg ctgccaattg 120

60 cggccactcca gcaccgcaga tgctgatgat caacaactac gaatacgtat ctttagcgtat 180
 gtgtacatca caatgaaatt cggggctaga gtatctggtg aaccgtgcat aaacgacctg 240

tgattggact	cttttcctt	gcaaaatgtt	ttccagcgg	atg	ttg	agt	ttt	gca	294								
				Met	Leu	Ser	Phe	Ala									
				1				5									
5	acc	ctt	cgt	ggc	cgc	att	tca	aca	gtt	gac	gct	gca	aaa	gcc	gca	cct	342
	Thr	Leu	Arg	Gly	Arg	Ile	Ser	Thr	Val	Asp	Ala	Ala	Lys	Ala	Ala	Pro	
	10						15						20				
10	ccg	cca	tcg	cca	cta	gcc	ccg	att	gat	ctc	act	gac	cat	agt	caa	gtg	390
	Pro	Pro	Ser	Pro	Leu	Ala	Pro	Ile	Asp	Leu	Thr	Asp	His	Ser	Gln	Val	
	25						30						35				
15	gcc	ggt	gtg	atg	aat	ttg	gct	gca	aga	att	ggc	gat	att	ttg	ctt	tct	438
	Ala	Gly	Val	Met	Asn	Leu	Ala	Ala	Arg	Ile	Gly	Asp	Ile	Leu	Leu	Ser	
	40						45						50				
20	tca	ggt	acg	tca	aat	agt	gac	acc	aag	gta	caa	gtt	cga	gca	gtg	acc	486
	Ser	Gly	Thr	Ser	Asn	Ser	Asp	Thr	Lys	Val	Gln	Val	Arg	Ala	Val	Thr	
	55						60						65				
25	tct	gct	tac	ggt	ttg	tac	tac	acg	cac	gtg	gat	atc	acg	ttg	aat	acg	534
	Ser	Ala	Tyr	Gly	Leu	Tyr	Tyr	His	Val	Asp	Ile	Thr	Leu	Asn	Thr		
	70						75						80			85	
30	atc	acc	atc	ttc	acc	aac	atc	ggt	gtg	gag	agg	aag	atg	ccg	gtc	acc	582
	Ile	Thr	Ile	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Val	Glu	Arg	Lys	Met	Pro	Val	Asn	
	90						95						100				
35	gtg	ttt	cat	gtt	gta	ggc	aag	ttg	gac	acc	aac	ttc	tcc	aaa	ctg	tct	630
	Val	Phe	His	Val	Val	Gly	Lys	Leu	Asp	Thr	Asn	Phe	Ser	Lys	Leu	Ser	
	105						110						115				
40	gag	gtt	gac	cgt	ttg	atc	cgt	tcc	att	cag	gct	ggt	gct	acc	ccg	cct	678
	Glu	Val	Asp	Arg	Leu	Ile	Arg	Ser	Ile	Gln	Ala	Gly	Ala	Thr	Pro	Pro	
	120						125						130				
45	gag	gtt	gcc	gag	aaa	atc	ctg	gac	gag	ttg	gag	caa	tcc	cct	gct	tct	726
	Glu	Val	Ala	Glu	Lys	Ile	Leu	Asp	Glu	Leu	Glu	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	
	135						140						145				
50	tat	ggt	ttc	cct	gtt	gct	ttg	ctt	ggc	tgg	gca	atg	atg	ggt	ggt	gct	774
	Tyr	Gly	Phe	Pro	Val	Ala	Leu	Leu	Gly	Trp	Ala	Met	Met	Gly	Gly	Ala	
	150						155						160			165	
55	gtt	gct	gtg	ctg	ttg	ggt	ggt	gga	tgg	cag	gtt	tcc	cta	att	gct	ttt	822
	Val	Ala	Val	Leu	Leu	Gly	Gly	Gly	Trp	Gln	Val	Ser	Leu	Ile	Ala	Phe	
	170						175						180				
60	att	acc	gcg	ttc	acg	atc	att	gcc	acg	acg	tca	ttt	ttg	gga	aag	aag	870
	Ile	Thr	Ala	Phe	Thr	Ile	Ile	Ala	Thr	Thr	Ser	Phe	Leu	Gly	Lys	Lys	
	185						190						195				
65	ggt	ttg	cct	act	ttc	caa	aat	gtt	gtt	ggt	ggt	ttt	att	gcc	acg	918	
	Gly	Leu	Pro	Thr	Phe	Phe	Gln	Asn	Val	Val	Gly	Gly	Phe	Ile	Ala	Thr	
	200						205						210				
70	ctg	cct	gca	tcg	att	gct	tat	tct	ttg	gct	ttg	caa	ttt	gg	ctt	gag	966
	Leu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ala	Tyr	Ser	Leu	Ala	Leu	Gln	Phe	Gly	Leu	Glu	
	215						220						225				
75	atc	aaa	ccg	agc	cag	atc	atc	gca	tct	gga	att	gtt	gtg	ctg	ttg	gca	1014
	Ile	Lys	Pro	Ser	Gln	Ile	Ile	Ala	Ser	Gly	Ile	Val	Val	Leu	Leu	Ala	
	230						235						240			245	

ggt ttg aca ctc gtg caa tct ctg cag gac ggc atc acg ggc gct ccg 1062
 Gly Leu Thr Leu Val Gln Ser Leu Gln Asp Gly Ile Thr Gly Ala Pro
 250 255 260
 5 gtg aca gca agt gca cga ttt ttc gaa aca ctc ctg ttt acc ggc ggc 1110
 Val Thr Ala Ser Ala Arg Phe Phe Glu Thr Leu Leu Phe Thr Gly Gly
 265 270 275
 10 att gtt gct ggc gtg ggt ttg ggc att cag ctt tct gaa atc ttg cat 1158
 Ile Val Ala Gly Val Gly Leu Gly Ile Gln Leu Ser Glu Ile Leu His
 280 285 290
 15 gtc atg ttg cct gcc atg gag tcc gct gca gca cct aat tat tcg tct 1206
 Val Met Leu Pro Ala Met Glu Ser Ala Ala Ala Pro Asn Tyr Ser Ser
 295 300 305
 20 aca ttc gcc cgc att atc gct ggt ggc gtc acc gca gcg gcc ttc gca 1254
 Thr Phe Ala Arg Ile Ile Ala Gly Gly Val Thr Ala Ala Ala Phe Ala
 310 315 320 325
 25 gtc ggt ttt tac gcg gag tgg tcc tcg gtg att att gcg ggg ctt act 1302
 Val Gly Cys Tyr Ala Glu Trp Ser Ser Val Ile Ile Ala Gly Leu Thr
 330 335 340
 30 gcg ctg atg ggt tct gcg ttt tat tac ctc ttc gtt gtt tat tta ggc 1350
 Ala Leu Met Gly Ser Ala Phe Tyr Tyr Leu Phe Val Val Tyr Leu Gly
 345 350 355
 35 ccc gtc tct gcc gct gcg att gct gca aca gca gtt ggt ttc act ggt 1398
 Pro Val Ser Ala Ala Ala Ile Ala Ala Thr Ala Val Gly Phe Thr Gly
 360 365 370
 40 ggt ttg ctt gcc cgt cga ttc ttg att cca ccg ttg att gtg gcg att 1446
 Gly Leu Leu Ala Arg Arg Phe Leu Ile Pro Pro Leu Ile Val Ala Ile
 375 380 385
 45 gcc ggc atc aca cca atg ctt cca ggt cta gca att tac cgc gga atg 1494
 Ala Gly Ile Thr Pro Met Leu Pro Gly Leu Ala Ile Tyr Arg Gly Met
 390 395 400 405
 50 tac gcc acc ctg aat gat caa aca ctc atg ggt ttc acc aac att gcg 1542
 Tyr Ala Thr Leu Asn Asp Gln Thr Leu Met Gly Phe Thr Asn Ile Ala
 410 415 420
 55 gtt gct tta gcc act gct tca tca ctt gcc gct ggc gtg gtt ttg ggt 1590
 Val Ala Leu Ala Thr Ala Ser Ser Leu Ala Ala Gly Val Val Leu Gly
 425 430 435
 60 gag tgg att gcc cgc agg cta cgt cgt cca cca cgc ttc aac cca tac 1638
 Glu Trp Ile Ala Arg Arg Leu Arg Arg Pro Pro Arg Phe Asn Pro Tyr
 440 445 450
 65 cgt gca ttt acc aag gcg aat gag ttc tcc ttc cag gag gaa gct gag 1686
 Arg Ala Phe Thr Lys Ala Asn Glu Phe Ser Phe Gln Glu Glu Ala Glu
 455 460 465
 70 cag aat cag cgc cgg cag aga aaa cgt cca aag act aat cag aga ttc 1734
 Gln Asn Gln Arg Arg Gln Arg Lys Arg Pro Lys Thr Asn Gln Arg Phe
 470 475 480 485
 75 ggt aat aaa agg taaaaatcaa cctgcttagg cgtctttcgc ttaaatacg 1786
 Gly Asn Lys Arg
 80 tagaatatcg ggtcgatcgc ttttaaacac tcaggaggat cttgccggc caaaatcacg 1846
 85

gacactcgtc ccacccaga atcccttcac gctgttgaag aggaaaccgc agccggggta 1906
 ccg 1909
 5
 <210> 4
 <211> 489
 <212> PRT
 <213> *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
 10
 <400> 4
 Met Leu Ser Phe Ala Thr Leu Arg Gly Arg Ile Ser Thr Val Asp Ala
 1 5 10 15
 15 Ala Lys Ala Ala Pro Pro Pro Ser Pro Leu Ala Pro Ile Asp Leu Thr
 20 25 30
 Asp His Ser Gln Val Ala Gly Val Met Asn Leu Ala Ala Arg Ile Gly
 35 40 45
 20 Asp Ile Leu Leu Ser Ser Gly Thr Ser Asn Ser Asp Thr Lys Val Gln
 50 55 60
 Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Tyr Gly Leu Tyr Tyr Thr His Val Asp
 25 65 70 75 80
 Ile Thr Leu Asn Thr Ile Thr Ile Phe Thr Asn Ile Gly Val Glu Arg
 85 90 95
 30 Lys Met Pro Val Asn Val Phe His Val Val Gly Lys Leu Asp Thr Asn
 100 105 110
 Phe Ser Lys Leu Ser Glu Val Asp Arg Leu Ile Arg Ser Ile Gln Ala
 115 120 125
 35 Gly Ala Thr Pro Pro Glu Val Ala Glu Lys Ile Leu Asp Glu Leu Glu
 130 135 140
 Gln Ser Pro Ala Ser Tyr Gly Phe Pro Val Ala Leu Leu Gly Trp Ala
 40 145 150 155 160
 Met Met Gly Gly Ala Val Ala Val Leu Leu Gly Gly Trp Gln Val
 165 170 175
 45 Ser Leu Ile Ala Phe Ile Thr Ala Phe Thr Ile Ile Ala Thr Thr Ser
 180 185 190
 Phe Leu Gly Lys Lys Gly Leu Pro Thr Phe Phe Gln Asn Val Val Gly
 195 200 205
 50 Gly Phe Ile Ala Thr Leu Pro Ala Ser Ile Ala Tyr Ser Leu Ala Leu
 210 215 220
 Gln Phe Gly Leu Glu Ile Lys Pro Ser Gln Ile Ile Ala Ser Gly Ile
 55 225 230 235 240
 Val Val Leu Leu Ala Gly Leu Thr Leu Val Gln Ser Leu Gln Asp Gly
 245 250 255
 60 Ile Thr Gly Ala Pro Val Thr Ala Ser Ala Arg Phe Phe Glu Thr Leu
 260 265 270
 Leu Phe Thr Gly Gly Ile Val Ala Gly Val Gly Leu Gly Ile Gln Leu
 275 280 285
 65

Ser Glu Ile Leu His Val Met Leu Pro Ala Met Glu Ser Ala Ala Ala
 290 295 300
 5 Pro Asn Tyr Ser Ser Thr Phe Ala Arg Ile Ile Ala Gly Gly Val Thr
 305 310 315 320
 Ala Ala Ala Phe Ala Val Gly Cys Tyr Ala Glu Trp Ser Ser Val Ile
 325 330 335
 10 Ile Ala Gly Leu Thr Ala Leu Met Gly Ser Ala Phe Tyr Tyr Leu Phe
 340 345 350
 Val Val Tyr Leu Gly Pro Val Ser Ala Ala Ala Ile Ala Ala Thr Ala
 355 360 365
 15 Val Gly Phe Thr Gly Gly Leu Leu Ala Arg Arg Phe Leu Ile Pro Pro
 370 375 380
 Leu Ile Val Ala Ile Ala Gly Ile Thr Pro Met Leu Pro Gly Leu Ala
 20 385 390 395 400
 Ile Tyr Arg Gly Met Tyr Ala Thr Leu Asn Asp Gln Thr Leu Met Gly
 405 410 415
 25 Phe Thr Asn Ile Ala Val Ala Leu Ala Thr Ala Ser Ser Leu Ala Ala
 420 425 430
 Gly Val Val Leu Gly Glu Trp Ile Ala Arg Arg Leu Arg Arg Pro Pro
 435 440 445
 30 Arg Phe Asn Pro Tyr Arg Ala Phe Thr Lys Ala Asn Glu Phe Ser Phe
 450 455 460
 Gln Glu Glu Ala Glu Gln Asn Gln Arg Arg Gln Arg Lys Arg Pro Lys
 35 465 470 475 480
 Thr Asn Gln Arg Phe Gly Asn Lys Arg
 485